

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（I）

# 目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造 …… 247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光 …… 262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘 …… 286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗 …… 300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝 …… 310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一 …… 318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田 恵理子 …… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井 洋士 …… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇 祥子 …… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍兒 …… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名 和 行文 …… 576

## アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析

所属 信州大学医学部、人体構造学・講師  
研究者 中山 耕造

### 1. 研究要旨

我々は、APPの細胞内ドメイン(APPIC)は、 $\gamma$ -セクレターゼによって細胞膜から切り出され、細胞質へと放出される事を示している。また我々は、APPICが神経細胞に選択的に核へ移行し、転写因子E2F1に結合し、アポトーシスを引き起こす事を明らかにしている。これらの結果から、APPICがE2Fファミリーを介してのアルツハイマー病の発症に関与している可能性が考えられた。この点を検証するために、本年度は、(1)脳内で、APPICの発現をコントロールできるトランスジェニックマウスを作製した。(2)APPIC結合蛋白質として、チュブリンを同定した。(3)E2F4の多型が、アルツハイマー病に関係している可能性を示した。

#### 分担研究者

- (1) エーザイ株式会社シーズ研究所  
佐藤 俊孝
- (2) 国立病院機構・久里浜アルコール症センター  
樋口 進

### 2. 研究目的

多くの神経疾患、特にアルツハイマー病は加齢に伴って発症し、現在のところ有効な治療法もない。従って高齢化社会において、有効な治療法の開発は急務であり、新規の創薬ターゲット分子を見いだすためにも、新しい観点からの病因の解明に期待が寄せられている。

NotchとDeltaは共に膜蛋白質で、神経細胞の分化において重要な役割をおこなっており、アルツハイマー病(AD)やCADASIL等の疾患との関連で注目されている。現在までは、Deltaは単なるNotchのリガンドであり、その細胞内ドメインに機能はないと考えられていた。しかしながら、我々はDeltaの細胞内ドメインは、 $\gamma$ -セクレターゼによって切り出され、核に移行して転写因子Smadに結合して転写を調節することを示している。近年になって、多くのI型膜蛋白質が $\gamma$ -セクレターゼによって切断され、細胞内ドメインが膜から切り出されることが知られてきている。従って、ある種の膜蛋白質ではDelta同様に、シグナルを受け取ると最終的に $\gamma$ -セクレターゼによって細胞内ドメインが切り出され、それが核に移行し、転写因子に結合して転写を調節する可能

性があるのではないかと考え、 $\gamma$ -セクレターゼによって調節されるシグナル伝達機構が広く存在する可能性を提唱している。

Amyloid Precursor Protein (APP)に関しても、国外の複数のグループから、 $\gamma$ -セクレターゼによって切断されて、細胞膜から切り出された細胞内ドメインが核に存在することが報告されている。これらのことから、我々は現在のところ生理的機能があまり解析されていないAPPも $\gamma$ -セクレターゼによって細胞内ドメインが切り出されることに注目して、NotchやDeltaと同様に、切り出された細胞内ドメインが核に移行して特定の遺伝子の転写を調節しており、それがADに関係している可能性を考えて研究している。

本年度は、アルツハイマー病における、APPの細胞内ドメインの病態への関与の可能性を検討し、以下の結果を得た。

- (1) 脳内で、APPICの発現をコントロールできるトランスジェニックマウスの作製。
- (2) APPIC結合蛋白質として、チュブリンを同定。
- (3) E2F4の多型が、アルツハイマー病に関係している可能性を示唆

### 3. 研究方法

#### トランスジェニックマウスの作製

バックが低い事より、Tet Offシステムを用いる事にした。ベクターとしては、pBIを用いた。このベクターは、中央に転写因子であるtTAの結合部位

である TRE を持ち、さらにその両側に両方向性に CMV のミニマムプロモーターを持っている。APPICcDNA の 5' 側に 3 個の Flag Tag を付け、この片方の CMV ミニマムプロモーターの下流にクローニングした。さらに、もう片側の CMV ミニマムプロモーターの下流に EGFP をクローニングした。

常法に従って発現ベクターを受精卵に注入して、100 個体のマウスを得た。生まれて来たマウスの離乳後、尾から DNA を抽出した。得られた DNA は、各種の制限酵素で消化して電気泳動により分離後、常法に従ってサザンブロッティングをおこなった。

脳内で APPIC の発現をコントロールできるマウスを得るために、現在、これらのトランスジェニックマウス 27 系統を CamKII-tTA トランスジェニックマウスと交配している。

#### E2F4 遺伝子の相関解析

Sequencing の対象とした症例はすべて日本人の AD 症例である。AD は臨床的に診断されたものであり、全症例が National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) が制定した "probable" AD の基準を満たしている。E2F4 の sequencing の対象としたのは 12 例の孤発 AD 症例である。Apolipoprotein E 遺伝子の  $\epsilon 4$  allele (APOE4) は、AD の強力な遺伝的リスク要因である。そこで、この影響を除外する意味で、我々の有する AD 症例の中で、APOE4 を有さない症例を sequencing の対象とした。

E2F4 の coding region を含む exon は全部で 10 ある。この全ての exon と両側の flanking intron をそれぞれ 40~60 base-pair (bp) ずつ sequencing した。ただし、3' 側の untranslated region については、stop codon より約 70bp までしか確認しなかった。Sequencing には、ABI Prism 310 Genetic Analyzer を使用した。Direct sequence に用いた PCR の primer 配列を表 2 に示す。ATG の start codon を含む exon を本報告書では exon 1 とする。Exon 9 および 10 は近傍に位置していたので、同じ primer set で一緒に sequence した。

その結果、exon 7 に VNTR を同定した。VNTR の repeat 数は、主に ABI Prism 310 Genetic Analyzer の波形で調べた。しかし、その repeat 数を確認するために、exon 7 の PCR 産物を 1 本鎖にして pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) に subcloning して再び sequence した。

#### アフィニティークロマトグラフィーによる APP 細胞内ドメイン結合タンパク質の単離と同定

神経細胞内に、APP の細胞内ドメインに結合するタンパク質があるのか否かについて、<sup>35</sup>S-Met ラベルによる実験を行った。P19 細胞を  $\alpha$ -MEM 培地で培養後、レチノイン酸添加、未添加群に分け、リプレーティングした。1 日培養後、<sup>35</sup>S-Met を添加して終夜

培養し、細胞内タンパク質をラベルした。培養後の細胞はホモジナイズ後に可溶性画分と膜画分に分け、それぞれの画分に大腸菌に発現させ精製した GST-APPIC フュージョン蛋白質を添加してインキュベートした後、グルタチオンセファロース (GE バイオサイエンス) を用いて細胞内ドメインタンパク質複合体を回収した。結合タンパク質は、バッファーでセファロースを洗浄後、NaCl 濃度を段階的に高くすることにより溶出した。

LC/MS によるタンパク質の同定は、LTQ (サーモエレクトロン) を用い、解析用ソフトウェア Mascot を用いて行った。

APPIC のチュブリン重合への影響は、以下の方法で検討した。PEM-G buffer (80mM PIPES pH 6.9-1mM EGTA-0.5mM MgCl<sub>2</sub>-10% Glycerol) で溶解したブタ脳チュブリン (2.5mg/ml) に、GST (コントロール)、あるいは GST-APPIC を加え、37°C でインキュベートして経時的に 350nm の吸光度を測定した。対照実験として、微小管蛋白重合を促進するタキソール (微小管の安定化、過剰形成を引き起こし、微小管の脱重合を起りにくくし、その結果がん細胞分裂を阻害して抗腫瘍活性を発揮) を用いた。

その他の実験方法は、通常の方法でおこなった。

#### (倫理面への配慮)

ヒトの試料を用いる研究は、厚生労働省の臨床研究の倫理指針に従って、国立療養所久里浜病院・臨床研究部で限局しておこなった。

## 4. 研究結果

#### 脳内で APPIC の発現をコントロールできるマウスの作製

常法に従って Tet-off 発現ベクターを受精卵に注入して、100 個体のマウスを得た。生まれて来たマウスの離乳後、尾から DNA を抽出した。得られた DNA は、各種の制限酵素で消化して電気泳動により分離後、常法に従ってサザンブロッティングをおこなった。

得られたシグナルは、BAS (フジフィルム) を用いて定量した。その結果、27 系統の導入遺伝子を持つトランスジェニックマウスを得た。そのうちの 7 系統は、1 コピーの導入遺伝子を持つと考えられた。

脳内で APPIC の発現をコントロールできるマウスを得るために、現在、これらの 27 系統のトランスジェニックマウスを CamKII-tTA トランスジェニックマウスと交配している。

両方の遺伝子を持ったマウスの同定は、離乳後に尾から DNA を抽出し PCR でおこなっており、その 1 例を図 1 に示す。写真上は、EGFP を増幅するプライマーを用いて PCR をおこなった結果であり、インタ

ーナルコントロールとしては Fc レセプターを増幅している。3、4、6 が陽性であることがわかる。写真中は、同様に tTA を PCR で増幅している。1、4、7 が陽性である。写真下は、これらの結果を確認するために別のプライマーセットを用いて tTA と EGFP を増幅したもので、4 が両方の遺伝子を持つダブルトランスジェニックマウスであることがわかる。

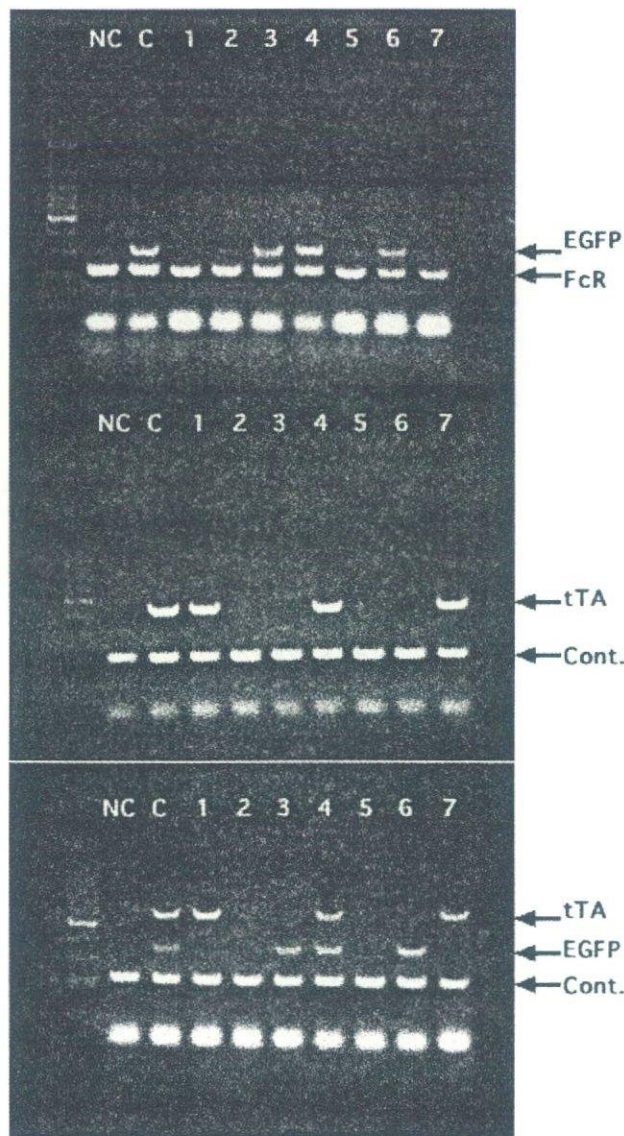


図 1. 交配で得られたマウスの、PCR による同定  
写真上は、EGFP を増幅するプライマーを用いて PCR をおこなった結果。写真中は、tTA を増幅した結果。写真下は、結果を確認するために別のプライマーセットを用いて tTA と EGFP を増幅したもの。  
N: ネガティブコントロール、C: ポジティブコントロール

## 行動異常を示すマウスにおける、APPIC の発現解析

これらの解析をおこなっているうちに、1-61 という系統のトランスジェニックマウスが、生後 10 ヶ月程度から head tossig 及び運動失調という行動異常を示すようになった。このマウスは CamKII-tTA マウスと交配していないもので、tTA の発現はないはずである。しかしながら、何らかの原因で APPIC が発現するようになったのではないかと考え、RT-PCR により検証した (図 2)。

コントロールとしては、系統 1-431 と CamKII-tTA トランスジェニックマウスを交配して得られたダブルトランスジェニックマウス (double)、pBI-EGFP/3XFLAG-APPIC のみを持つマウス (EGFP)、CamKII-tTA のみを持つマウス (CamKII) を用いた。図 2 に示すように、全てのコントロールマウスにおいて、APPIC の発現は認められなかった。しかしながら、行動異常を示した系統 1-61 では、大脳のみならず小脳でも、有為に APPIC が発現している事が明らかとなった。

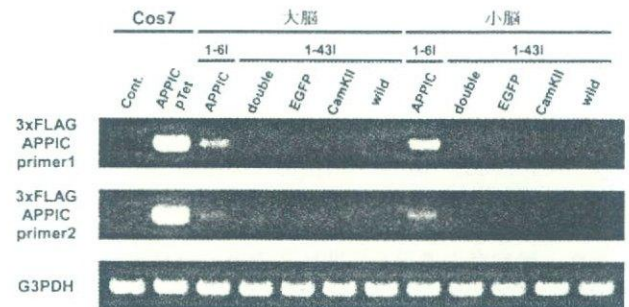


図 2. 行動異常を示す 1-61 マウス脳における、RT-PCR による APPIC の発現検討

1-61 マウス、及びコントロールとして系統 1-431 と CamKII-tTA トランスジェニックマウスを交配して得られた各種マウスの大脳と小脳から RNA を抽出し、2 種類のプライマーセットを用いて RT-PCR をおこなった。

インターナルコントロールとしては、G3PDH を増幅した。ポジティブコントロールとしては、Cos7 細胞に APPIC を発現させたものを用いた。

## E2F4 遺伝子の coding region の sequencing

12 例 AD 症例における E2F4 遺伝子の sequencing の結果、exon7 以外に variation は全く同定できなかった。Exon 7 の VNTR は、AGC または CAG の triplet repeat で、wild type は 13 リピートである。

## E2F4 遺伝子の相関解析

AD 群と control 群で E2F4 exon7 の VNTR の genotype および allele 頻度を比較した。表 1 のよ

うに, triplet repeat は 10 から 16 に分布していた。しかし, wild type の 13 repeat の数が圧倒的に多く, 相関研究には必ずしも informative とは言えない多型である。AD と control の分布を比較すると, control 群に比べて AD 群で long allele (14 repeat から 16 repeat) の頻度が多く, 逆に short repeat (10 repeat から 12 repeat) が少ない傾向があった。AD 症例で, 非常に稀有な 16 repeat のホモ接合体が 1 例存在した。

表 2 は, short allele を有する者, および long allele を有する者をそれぞれ 1 群にまとめたものである。表の通り, 上記の傾向がより明らかで, AD と control 間で分布に有意差が認められる。

表 1. *E2F4* gene の VNTR をマーカーとしたアルツハイマー病と健常者の遺伝子相関研究結果

genotype	AD	Control
10/13	0 (0.0%)	3 (0.9%)
11/13	0 (0.0%)	4 (1.2%)
12/13	3 (0.9%)	4 (1.2%)
13/13	303 (89.6%)	305 (91.0%)
13/14	18 (5.3%)	12 (3.6%)
13/15	9 (2.7%)	7 (2.1%)
13/16	4 (1.2%)	0 (0.0%)
16/16	1 (0.3%)	0 (0.0%)
計	38 (100.0%)	35 (100.0%)

AD vs Control

$\chi^2 = 13.5863$ ,  $df = 7$ ,  $P = 0.0590$ .

表 2. *E2F4* gene の VNTR をマーカーとしたアルツハイマー病と健常者の遺伝子相関研究結果 (short allele と long allele をグループ化したもの)

Genotype	AD	Control
10-12/13	3 (0.9%)	1 (3.3%)
13/13	3 (89.6%)	5 (91.0%)
14-16, 16/16	2 (9.5%)	9 (5.7%)
計	3 (100.0%)	5 (100.0%)

AD vs Control

$\chi^2 = 7.8785$ ,  $df = 7$ ,  $P = 0.0195$ .

### アフィニティークロマトグラフィーによる APPIC 結合タンパク質の単離と同定

$^{35}\text{S}$ -Met を培地に加え, P19 細胞をラベルした。その細胞から各フラクションを調整し, GST-APPIC フェージョン蛋白質をもちいて結合蛋白質を検索した (図 3)。

この図から明らかなように, 分化後の細胞質画分において, 分子量 50,000 付近に非常に特異的で顕著なバンドを認めた (①)。そしてこのバンドに相当するタンパク質は, NaCl 濃度を高くすることで, 細胞内ドメインから溶出されることが明らかになった (②, ③)。また, 膜画分においても, 分子量 105,000 付近に特徴的なバンドを認めた (①)。このタンパク質は, 細胞質画分にも認める)。なお, コントロールとして GST 蛋白質のみを用い, これらの蛋白質は単独の GST には結合しないことを確認してある。

そこでこれらのタンパク質を同定するために, マウス脳ホモジネートを用いて, タンパク質を大量に精製した。マウス脳を用いても分子量 50,000 付近のタンパク質が顕著に回収され (矢印), 分子量 105,000 付近のタンパク質は, NaCl 濃度 0.3-0.4M 付近に認められた。

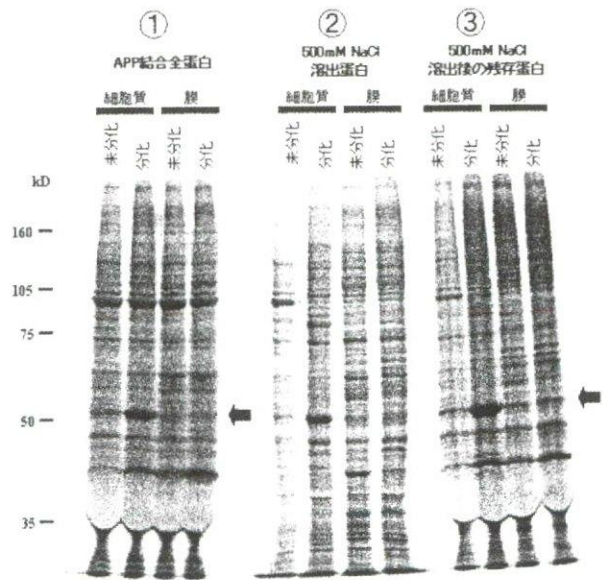


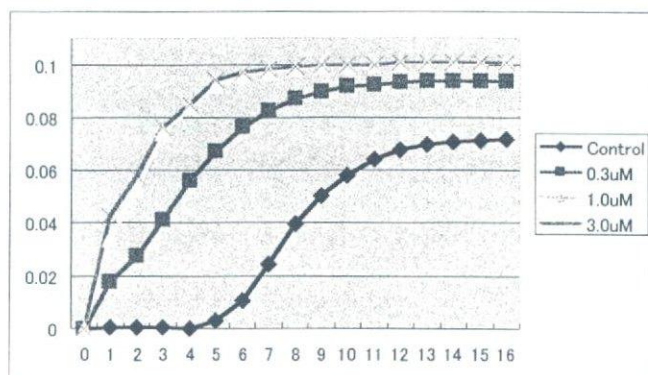
図 3.  $^{35}\text{S}$ -Met ラベルによる細胞内ドメイン結合タンパク質の検索。分子量 50,000 に強いバンドが見られた (矢印)。

これらのタンパク質を質量分析で解析した結果, 分子量 50,000 付近のタンパク質は,  $\beta$  チュブリンであることが明らかとなった。そこでまず, 分子量 50,000 付近のタンパク質が確かに  $\beta$  チュブリンであることを確認するために, 脳に多く存在するクラス III  $\beta$  チュブリンを認識する抗 Tuj 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果, 免疫沈降により回収されたタンパク質は, Tuj 抗体で強く染色された。また, クラス III  $\beta$  チュブリンが APPIC に結合する事は, 免疫沈降を用いて明らかにしている。

### APPIC のチュブリン重合に対する影響の検討

図 4 に示したように, APPIC はチュブリン重合に対して, タキソールのように明確ではないが, 促進的に働くと考えられた。一方, コントロールとした GST においても若干促進的に働くような傾向があることから, GST を酵素的に除去した細胞内ドメインの調製を試みているが, 容易に凝集体を形成してしまうことから, 難航している。

## Taxol



## GST-APP-40ug

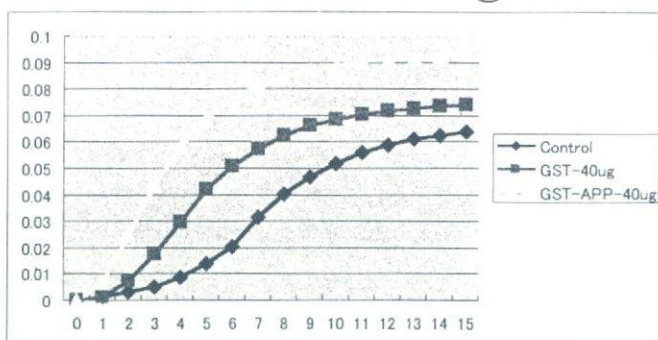


図4。チュブリン重合に対する APPIC の影響

横軸に時間 (分)、縦軸に 350nm の吸光度を示した。また、比較用としてとして Taxol を加えた場合も示した。

## 5. 考察

中央に転写因子である tTA の結合部位である TRE を持ち、さらにその両側に両方向性に CMV のミニマムプロモーターを持っているトランスジェニックマウスを 27 系統作製した。これらのマウスにおいて、片方のプロモーターの下流には APPICcDNA が、もう片側のプロモーターの下流に EGFP をクローニングされている。

脳内で APPIC の発現をコントロールできるマウスを得るために、現在、これらの得られたトランスジェニックマウス 27 系統を CamKII-tTA トランスジェニックマウスと交配している。CamKII-tTA トランスジェニックマウスは、CamKII プロモーターの下流に tTA を連結しているために、脳内、特に海馬と前頭葉で強く tTA を発現している。従って、交配によって得られたダブルトランスジェニックマウスでは、tTA によって脳内、特に海馬と前頭葉で強く APPIC が発現誘導されるはずである。また、通常は飲み水に Dox を加える事によって発現を抑制することができ、必要に応じて飲み水から Dox を除く事により発現を誘導できるはずである。従って、本実験のように強い毒性が予想できる場合最適な系だと考えることができる。

アルツハイマー病では、発症初期に海馬と前頭葉が障害される事が知られており、本実験で得られたダブルノックアウトマウスは良いモデル動物となる可能性があり、今後各種の解析をおこなう予定である。

1-61 という系統のトランスジェニックマウスが、生後 10 ヶ月程度から head tossig 及び運動失調という行動異常を示すようになった。このマウスは CamKII-tTA マウスと交配していないもので、tTA の発現はないはずである。しかしながら図 2 に示したように、何らかの原因で APPIC が大脳及び小脳で発現するようになったと考えられる。

生後すぐではなく、10 ヶ月程度たってから行動異常を起こした事は、アルツハイマー病が発症するのに長時間を必要とすることを考えたとき、極めて興味深い。今後、病的及び行動学的な解析を進めて行く予定である。

なお、この系統にみられる運動失調は、この系統では APPIC が小脳でも発現している事を反映しているのではないかと考えており、この点も明らかにする予定である。

E2F4 遺伝子と AD のリスクについて、AD の臨床例と正常コントロールを用いて検討を加えた。まず、12 例の AD 症例の E2F4 遺伝子 coding region の sequencing を行い、exon 7 に AGC または CAG の triplet repeat の VNTR を同定した。この VNTR をマーカーにして、case-control デザインの遺伝子相関解析を行った。その結果、VNTR の long allele が AD の高リスク、short allele が AD の低リスクに関連している可能性が示唆された。また、この関係は APOE4 を有さない群でより顕著に認められた。E2F4 遺伝子 exon 7 の VNTR は、その約 90% が 13/13 のホモ接合体であり、この多型の AD のリスク全体への影響は小さいと考えられる。しかし、この多型の機能解析は AD の発症メカニズムの解明に寄与しうるかもしれない。

前述したように、Exon 7 の VNTR は、AGC または CAG の triplet repeat で、wild type は 13 リピートである。この VNTR は既に報告されており、大腸がん、胃がん等で検討がなされている。しかし、残念ながら、この多型の生理学的意義については検討されていないため、今後の重要な課題だと考えられる。

種々の解析により、APP 細胞内ドメインと顕著に相互作用するタンパク質がチュブリンであることが明らかとなったが、クラス特異性は低いようであった。また、チュブリンの重合を促進する傾向が認められた。現在、APP 細胞内ドメインが細胞死を起こす過程を理解するために、分化に伴うたんぱく質の変動を解析中である。



## 6. 結論

(1) 脳内で APPIC の発現をコントロールできるマウスを得るために、Tet-Off システム用のベクターに APPICcDNA を連結して、27 系統のトランスジェニックマウスを作製した。

そのうちの 1 系統は Tet システムに依存せずに APPIC を発現しており、行動異常を示した。

なお、本研究は新潟大学脳研究所・横山峯介教授、佐藤俊哉博士、及び三菱化学生命科学研究所・中村健司室長との共同研究である。

(2) *E2F4* 遺伝子に焦点を当てて、coding region の sequencing、同定された VNTR を用いた遺伝子相関解析を行った。その結果、*E2F4* の exon 7 に AGC または CAG の triplet repeat を同定し、多型の存在を確認した。相関解析の結果、この repeat の long allele は AD の高リスクに、short allele は AD の低リスクに関係していることが示唆された。

また、これらの関係は *apolipoprotein E* 遺伝子の  $\epsilon 4$  allele (*APOE4*) を有さない AD 症例でより顕著に認められた。*E2F4* 遺伝子 exon 7 の VNTR は、その約 90% が 13/13 のホモ接合体であり、この多型の AD のリスク全体への影響は小さい。しかし、この多型の機能解析は AD の発症メカニズムの解明に寄与する可能性がある。

(3) APPIC 結合蛋白質として、チュブリンを同定した。

さらに、APPIC はチュブリンの重合を促進することを明らかにした。

## 7. 論文

(1) Kuwano R, Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Tsukie T, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y: Dynamin-binding protein gene on chromosome 10q is associated with late-onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 15(13): 2170-2182, 2006.

(2) Miyasaka K, Hosoya H, Sekine A, Ohta M, Amano H, Matsushita S, Suzuki K, Higuchi S, Funakoshi A: Association of ghrelin receptor gene polymorphism with bulimia nervosa in a Japanese population. *J Neural Transm* 113(9): 1279-1285.

(3) Kimura M, Kimura S, Matsushita S, Kashima H, Higuchi S: ALDH2 promoter polymorphism has no effect on the risk for alcoholism. *Alcohol Alcohol* 41(4): 368-371, 2006.

(4) Yokoyama A, Mizukami T, Omori T, Yokoyama T,

Hirota T, Matsushita S, Higuchi S, Maruyama K, Ishii H, Hibi T: Melanosis and squamous cell neoplasms of the upper aerodigestive tract in Japanese alcoholic men. *Cancer Sci* 97(9): 905-911, 2006.

(5) Mochizuki H, Masaki T, Matsushita S, Kamakura K, Motoyoshi K, Higuchi S: Disinhibition of somatosensory evoked potential recovery in alcoholics. *Eur J Neurol*. 13(8): 896-900, 2006.

(6) Yokoyama A, Omori T, Yokoyama T, Sato Y, Mizukami T, Matsushita S, Higuchi S, Maruyama K, Ishii H, Hibi T: Risk of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in cancer-free alcoholic Japanese men: an endoscopic follow-up study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(11): 2209-2215, 2006.

(7) Higuchi S, Matsushita S, Kashima H: New findings of the genetic influence of alcohol use and dependence. *Curr Opin Psychiatry* 19(3): 253-265, 2006.

(8) Yokoyama A, Yokoyama T, Ohmori T, Matsushita S, Mizukami T, Takahashi H, Higuchi S, Maruyama K, Ishii H, Hibi T: Helicobacter pylori, chronic atrophic gastritis, inactive aldehyde dehydrogenase-2, macrocytosis and multiple upper aerodigestive tract cancers and the risk for gastric cancer in alcoholic Japanese men. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007 22(2):210-217.

(9) Yokoyama A, Ohmori T, Tanaka Y, Yokoyama T, Sugiura H, Mizukami T, Matsushita S, Mizukami T, Higuchi S, Maruyama K, Ishii H, Hibi T: p53 protein accumulation, cancer multiplicity, and aldehyde dehydrogenase-2 genotype in Japanese alcoholic men with early esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 247: 243-252, 2007.

(10) Matsushita S, Suzuki G, Matsui T, Takasugi K, Yuzuriha T, Yokoyama A, Masaki T, Yoshida Y, Arai H, Higuchi S: Increased risk for silent brain infarction and deep white matter lesions in alcoholism. *J Psychiatric Res*, in press.

(11) Iwasaki S, Ishiguro H, Higuchi S, Onaivi ES, Arinami T: Association study between alcoholism and endocannabinoid metabolic enzyme genes encoding fatty acid amide hydrolase and monoglyceride lipase in Japanese population. *Psychiatr Genet*, in press.

(12) Ishiguro H, Iwasaki S, Teasenfitz L, Higuchi S, Horiuchi Y, Saito T, Arinami T,

Onaivi ES: Involvement of cannabinoid CB2 receptor in alcohol preference in mice and alcoholism in humans. *Pharmacogenomics J*, in press.

(13) Sasabe T, Furukawa A, Matsushita S, Higuchi S, Ishiura S: Association analysis of the dopamine receptor D2(DRD2) SNP rs1076560 in alcoholic patients. *Neurosci Lett*, in press.

(14) Tian B.Q., Suzuki T., Yamauchi T., Sakagami H., Yoshimura Y., Miyazawa S., Nakayama K., Saitoh F., Zhang J., Lu Y., Kondo H. and Endo S. Interaction of LDL receptor-related protein 4 (LRP4) with postsynaptic scaffold proteins via its C-terminal PDZ domain-binding motif, and its regulation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 2864-2876, 2006

(15) 脱髄疾患モデルと細胞治療-特に神経幹細胞移植療法について

高昌星、三好征司、中山耕造、Seung U. KIM  
*神経研究の進歩*, 50, 525-537, 2006

(16) Hiratochi M., Nagase H., Kuramochi Y., Imamura T., Koh C. S., Ohkawara T. and Nakayama K. The Delta intracellular domain mediates TGF- $\beta$ /Activin signaling through binding to Smads and has an important bi-directional function in the Notch-Delta signaling pathway.

*Nucleic Acids Research*, 35, 912-922, 2007

2. 特許出願  
なし

---

平成18年度  
政策創薬総合研究  
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団  
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル(小伝馬町駅前)4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社